

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2003 年 9 月 18 日 (18.09.2003)

PCT

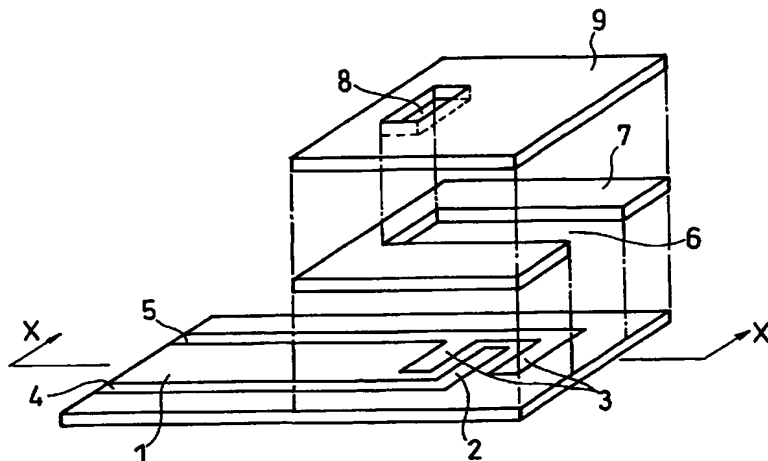
(10) 国際公開番号  
WO 03/076919 A1

- (51) 国際特許分類: G01N 27/327 (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 松下電器産業株式会社 (MATSUSHITA ELECTRIC INDUSTRIAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒571-8501 大阪府 門真市 大字門真 1 0 0 6 番地 Osaka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/02613
- (22) 国際出願日: 2003 年 3 月 5 日 (05.03.2003) (72) 発明者; および
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 桑畑 進 (KUWA-BATA, Susumu) [JP/JP]; 〒565-0872 大阪府 吹田市 上山田 1-7-1 0 1 7 Osaka (JP). 中南 貴裕 (NAKAMINAMI, Takahiro) [JP/JP]; 〒604-0903 京都府 京都市 中京区 指物町 3 2 5-5 0 3 Kyoto (JP).
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2002-62963 2002 年 3 月 8 日 (08.03.2002) JP (74) 代理人: 石井 和郎, 外 (ISHII, Kazuo et al.); 〒541-0041 大阪府 大阪市 中央区北浜 2 丁目 3 番 6 号 北浜山本ビル Osaka (JP).

[続葉有]

(54) Title: SUBSTRATE DETERMINING METHOD

(54) 発明の名称: 基質の定量方法



(57) Abstract: A method for accurately determining the quantity of the substrate in a sample liquid by using a simple structure measurement system without causing a measurement error attributed to an inhibiting substance. In the method for determining the substrate in a sample liquid containing the substrate and a dissolved inhibiting substance by using an electrode system and a reagent system, (a) the sample liquid containing the dissolved substance and the substrate is fed to the electrode system including a working electrode and a counter electrode in the presence of the reagent system containing an oxidation-reduction enzyme and an electron carrier, (b) an AC voltage is applied to the working electrode to cause an oxidation-reduction reaction of the electron carrier, (c) the electric signal generated by the oxidation-reduction reaction is measured by the electrode system, and (d) the quantity of the substrate is determined on the basis of the electric signal.

(57) 要約: 簡易な構成の測定系により、阻害物質による測定誤差を生じることなく、試料液中に含まれる基質を正確に定量することができる方法を提供する。電極系及び試薬系を用い、溶解した阻害物質及び基質を含む試料液の前記基質を定量する方法において、

[続葉有]

Best Available Copy

WO 03/076919 A1



(81) 指定国 (国内): CN, JP, US.

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(a) 酸化還元酵素及び電子伝達体を含む試薬系の存在下で、作用極及び対極を含む電極系に、溶解した阻害物質及び基質を含む試料液を供給し、(b) 前記作用極に交流電位を印加し、前記電子伝達体の酸化還元反応を生じさせ、(c) 前記酸化還元反応に基いて生じた電気信号を前記電極系により測定し、ついで(d) 前記電気信号に基づいて前記基質を定量する。

## 明 細 書

## 基質の定量方法

## 技術分野

本発明は、酸化還元酵素を用いて試料中に含まれる基質を電気化学的に定量する方法に関する。

## 背景技術

試料中に存在する特定の基質を簡易に測定及び定量するための方法が数多く開発されている。なかでも、近年、酵素が有する基質選択的触媒作用を利用することによって、選択性良く測定及び定量する方法が注目を集めており、一部の方法は体液中の特定成分の定量を行う方法として、臨床検査の分野、さらには一般の人々による自己検査の分野において用いられている。

試料中の基質を定量測定する方法の一例として、グルコースの電気化学的定量法について述べる。グルコースオキシダーゼ（以下、 $\text{GOx}$ と略称する）はグルコースの酸化を選択的に触媒する酵素である。 $\text{GOx}$ とグルコースを含む反応液中に、一定量の酸化型の電子伝達体（反応によって生じた電子を酵素から電極へと伝達する化合物）を存在させると、グルコースの酸化にともなって酸化型の電子伝達体が還元され、還元型の電子伝達体が生成する。生成した還元型の電子伝達体を、直流電位を印加した電極を用いて酸化して、流れる電流を測定する。このとき流れる電流は、 $\text{GOx}$ とグルコースとの反応により生成した還元型の電子伝達体の量に比例し、かつその還元型の電子伝達体の量はグルコースの含

有量に比例するため、かかる測定によってグルコースを定量することができる。

また、酵素と電子伝達体とともに電極上に乾燥して担持させ、バイオセンサ電極素子を作成することが可能である。このような技術に基づいた使い捨て型のグルコースセンサの開発は近年多くの注目を集めている。その代表的な例が、日本国特許第 2 5 1 7 1 5 3 号明細書に示されるバイオセンサである。使い捨て型のグルコースセンサにおいては、測定器に着脱可能に接続されたセンサ素子に試料液を導入するだけで容易にグルコース濃度を測定することができる。

以上では、試料中に存在する特定の基質を簡易に測定及び定量するための方法について述べたが、基質定量法ではなく、一般的な電気化学測定法の一つとして、電極に直流電位ではなく交流電位を印加して、得られる電気信号を測定する方法（以下、交流法と呼ぶ）が存在する。これは、主に電極／電解液界面の構造に関する情報を得るための方法であり、例えば二次電池の活物質担持電極の特性評価がこのような測定法を用いることによって行われている。

前述したように、酵素を用いることにより、基質選択性の比較的高い測定が実現されるが、これまでに用いられてきた直流電位を印加する電気化学的測定においては、試料中に含まれる測定対象となる基質以外の物質の影響によって測定誤差が引き起こされていた。例えば、血液を試料として電気化学測定を行う場合、血液中に含まれるアスコルビン酸（ビタミン C）、尿酸、及びアセトアミノフェンなどの易酸化性の化合物が誤差を引き起こす原因となる。これらのような、直流電位を印加する測定において誤差を生む物質は阻害物質と呼ばれる。

以下、従来の方法において、阻害物質による電流誤差が生じる理由を、図 5 を用いて説明する。図 5 は、G O x、電子伝達体及びグルコースが

溶解した溶液、並びに阻害物質の溶液において得られる、電極電位と電流の関係の例を示すグラフである。従来の方法によるグルコースの定量においては、通常、電子伝達体が十分酸化される電位  $E_1$  を電極に印加することによって、電流が得られる。 $E_1$  を電極に印加した場合、図 5 から明らかなように、阻害物質の電極での電気化学的酸化も十分に進行する。この阻害物質の電気化学的酸化により流れる電流 ( $I_3$ ) が、グルコースに対する電流 ( $I_1$ ) に重畳するため、グルコースの測定に正誤差が生じる。仮に電子伝達体が、中程度に酸化されるような電位、例えば図 5 に示す  $E_2$  を用いたとしても、阻害物質による電流は回避することができず、さらには阻害物質による電流が全電流内で占める割合が増え、 $S/N$  比が悪化してしまう。

阻害物質が酸化されない電位  $E_3$  よりも負な酸化還元電位を有する化合物を電子伝達体として用いると、原理的には誤差は生じないことになる。そのような化合物を用いたグルコースの定量を行う試みがいくつかなされている。しかし、この場合、 $GOx$  と該化合物との間の電位差が小さくなってしまうことにより、それらの間の電子移動速度が非常に遅くなる、あるいは全く起こらなくなる。その結果、グルコースの定量を行うための電流が検出可能なほどに大きくなり、あるいは電流を検出するために非常に長時間を有する、さらには電流を全く得ることができないという問題点があった。

また、阻害物質の血中濃度は、各個人によって異なり、また、同一人物であっても日々変化する。そのため、阻害物質の血中濃度について生ずる測定誤差を予測し、これを補正することは従来の測定では非常に困難であった。

阻害物質の影響を補正、あるいは除去するために様々な方策が試みられている。例えば、米国特許第 6 3 4 0 4 2 8 号公報においては、作用

極及び対極以外に、妨害物質測定用の第3の電極を設けることによって、妨害物質の影響を補正する方法及びセンサが開示されている。酵素反応の進行、及びそれに続く作用極での基質の測定に先立って、試料中に含まれる妨害物質の測定を第3の電極にて行うことにより、良好な補正が実現されている。

また、妨害物質の影響を除去するための方法としては、妨害物質の電極への拡散をブロックする膜を電極上に配置することによって、妨害物質による電流を抑制する方法が開発されている。例えば、Wang, J.らは、Electroanalysis 1996, 8, 1127-1130.において、ポリ（オ－フェニレンジアミン）膜の使用を開示している。

このように、試料中に存在する特定の基質を測定及び定量するために用いる、従来の直流電位を使用した電気化学的方法において、妨害物質による影響の補正、あるいは除去を実現するためには、センサ素子あるいは電極の構成を複雑にすることが必要であった。

そこで、本発明は、上記従来の問題点に鑑み、簡易な構成の測定系により、妨害物質による測定誤差を生じることなく、試料液中に含まれる基質を正確に定量することができる方法を提供することを目的とする。

#### 発明の開示

本発明は、電極系及び試薬系を用い、溶解した妨害物質及び基質を含む試料液の前記基質を定量する方法であって、

（a）酸化還元酵素及び電子伝達体を含む試薬系の存在下で、作用極及び対極を含む電極系に、溶解した妨害物質及び基質を含む試料液を供給する工程、

（b）前記作用極に交流電位を印加し、前記電子伝達体の酸化還元反応を生じさせる工程、

(c) 前記酸化還元反応に基いて生じた電気信号を前記電極系により測定する工程、ならびに

(d) 前記電気信号に基づいて前記基質を定量する工程を含むことを特徴とする基質の定量方法に関する。

前記工程 (a) において、前記作用極及び前記対極を同一平面上に配置することが好ましい。

また、前記工程 (a) において、前記作用極及び前記対極を、空間を隔てて対向させて配置することが好ましい。

前記基質の定量方法は、前記作用極に直流電位を印加する工程 (e)、及び前記工程 (e) において生じた電気信号を測定する工程 (f) をさらに含むことが好ましい。

前記工程 (b) において、前記交流電位の中心電位が、前記電子伝達体の酸化還元電位に対して  $-0.1\text{ V} \sim +0.1\text{ V}$  の範囲内にあり、かつ前記阻害物質の前記作用極での反応が拡散律速領域となる電位領域のなかで、最も負の電位から  $0.05\text{ V}$  負の電位よりも正の電位であることが好ましい。

また、前記電気信号がインピーダンスであることが好ましい。

また、前記電極系がさらに参照極を含むことが好ましい。

また、前記作用極が回転ディスク電極またはマイクロ電極であることが好ましい。

前記酸化還元酵素がグルコースオキシダーゼまたはピロロキノリンキノン依存型グルコースデヒドロゲナーゼであり、前記電子伝達体がフェロセンカルボン酸であることが好ましい。

また、前記酸化還元酵素がピロロキノリンキノン依存型グルコースデヒドロゲナーゼであり、前記電子伝達体がルテニウムヘキサシアネートであることが好ましい。

## 図面の簡単な説明

図 1 は、本発明の一実施例において用いたバイオセンサの試薬系を除いた斜視図である。

図 2 は、図 1 に示すバイオセンサの要部を示す縦断面図（X-X線断面図）である。

図 3 は、本発明の実施例において、インピーダンス  $Z$  の実数要素と虚数要素をプロットしたグラフである。

図 4 は、本発明に係る基質の定量方法を実施するために用いる測定装置の一例の構成を示す図である。

図 5 は、従来の方法において、 $GOx$ 、電子伝達体及びグルコースが溶解した溶液、並びに阻害物質の溶液について得られる、電極電位と電流の関係を示す図である。

## 発明を実施するための最良の形態

本発明に係る基質の定量方法は、（a）酸化還元酵素及び電子伝達体を含む試薬系の存在下で、作用極及び対極を含む電極系に、溶解した阻害物質及び基質を含む試料液を供給する工程、（b）前記作用極に交流電位を印加し、前記電子伝達体の酸化還元反応を生じさせる工程、

（c）前記酸化還元反応に基いて生じた電気信号を前記電極系により測定する工程、ならびに（d）前記電気信号に基づいて前記基質を定量する工程を含むことを特徴とする。

このような本発明に係る基質の定量方法によれば、阻害物質の影響を受けずに基質の測定を行うことが可能となる。その理由を以下に述べる。

交流測定は、ある一定の直流電位を中心電位として用い、その中心電位に対して微小な振幅の交流電位成分を重畳させて含む交流電位を作用



極に印加し、得られる電気信号を測定する測定法である。測定装置としては、例えば図 4 に示すようなものが用いられる。

図 4 に示す測定装置は、波形生成器 2、 $i/E$ コンバータ 3、ロックインアンプ 4、ポテンショスタット 5、及び低域フィルタ 6 を具備する。波形生成器 2 で交流電位を生成し、ポテンショスタット 5 で中心電位をコントロールする。ついで、バイオセンサ 1 の作用極での反応により得られる電流を、 $i/E$ コンバータ 3 で電圧信号に変換し、ロックインアンプ 4 及び低域フィルタ 6 により、それぞれ交流成分と直流成分を得る。これらの成分を用いることにより、後述するように、基質の定量を行うことができる。

直流サイクリックボルタンメトリーと比較しながら交流測定について以下に説明する。まず、阻害物質が溶解していない試料液を用い、かつ上記の本実施の形態における基質の定量方法と同様の電極系と試薬系を用いた場合の直流サイクリックボルタンメトリーについて考える。この場合、電流 ( $I$ ) と電位 ( $E$ ) との間にはいわゆる触媒波が観測される。また、電位走査速度を速くした場合でも、電子伝達体に由来するアノード (またはカソード) ピークを持たないシグモイド波形を、通常得ることができる。このシグモイド波形が得られるような系で、比較的遅い電位走査速度を用いて直流サイクリックボルタンメトリーを行うと、アノード波とカソード波の間のヒステリシスはほとんど観測されなくなる。したがってこの場合、電位変化に対する電流変化の割合 ( $dI/dE$ ) は、実質上オームの法則に則り、系の抵抗成分 ( $R$ ) の逆数を示すこととなる。

次に、同様の系で交流測定を行った場合を考える。上述したような、比較的遅い電位走査速度を用いた直流サイクリックボルタンメトリーにヒステリシスがほとんど存在しないことと同様に、比較的低い周波数を

用いた交流測定においては、交流電流 ( $I_{ac}$ ) と交流電位 ( $E_{ac}$ ) との間には位相差がほとんど生じない。よって、このときの系の抵抗成分であるインピーダンス ( $Z$ ) は  $d I_{ac} / d E_{ac}$  に基づくものである。 $Z$  を測定して、その実数要素を横軸に、負の虚数要素を縦軸にプロット (複素インピーダンスプロット) する。上述したように比較的低い周波数においては電流-電位間に位相差がほとんどないので、プロット群は実数軸付近に、ある大きさ  $|Z_0|$  を有して存在することとなる。徐々に周波数を高くしていくと、系の容量成分の影響が出るため、 $Z$  の大きさは減少し、そのプロット群は  $|Z_0|$  を直径とする円弧でほぼ近似できる曲線を形成する。

交流法における  $d I_{ac} / d E_{ac}$  は、直流サイクリックボルタンメトリーと同様に、系に含まれる基質量の増加にともない増大する。ゆえに、複素インピーダンスプロットにおける  $|Z_0|$  は基質量の増加にともない減少し、その結果、得られる円弧の直径の大きさが基質量の増加にともない減少する。したがって、交流法によって得られる電気信号を測定することにより、試料液中に含まれる基質の量を測定または定量することが可能である。ここで、作用極に印加する交流電位の中心電位を電子伝達体の酸化還元電位付近 (例えば図5における  $E_2$  付近) に設定すると、 $d I_{ac} / d E_{ac}$  が大きくなり、かつ基質の量の変化にともなう電気信号の変化量が大きくなるので好ましい。

一方、阻害物質のみが含まれる電解液を用いた場合を考える。この場合、阻害物質の電極での反応がほぼ拡散律速となる電位領域 (例えば図5における  $E_4 \sim E_1$ ) では、直流サイクリックボルタンメトリーにおける  $d I / d E$  は実質的にほぼ無視できる大きさとなる。したがって、交流測定においては、上記のような電位範囲に、作用極に印加する交流電位の中心電位がある場合、電位変調に対する阻害物質由来の電流変化

( $d I_{ac} / d E_{ac}$ ) はほぼ実質的に無い。

電極における電気化学反応が複数並行して進行している場合、得られる電流は基本的に、各々の電気化学反応により流れる電流の単純な和となる。例えば、図 5 における二つの溶液組成を合わせた電解液においては、電位  $E_1$  を用いた場合、得られる電流は  $I = I_1 + I_3$  になる。このように、電流と電位の関係、及びその関係から得られる  $R$  や  $Z$  に関する議論については、基質と阻害物質が混合している試料液を用い、かつ上記の本実施の形態における基質の定量方法と同様の電極系と試薬系を用いた場合においても、前述のような基質を含む電解液、あるいは阻害物質を単独に含む電解液における説明が、基質及び阻害物質に対してそれぞれ成り立ち、その結果、例えば、電位  $E_2$  付近における  $d I_{ac} / d E_{ac}$  は、前述の基質を含み、阻害物質を含まない電解液で得られるそれと実質的にほぼ同じであり、阻害物質による  $d I_{ac} / d E_{ac}$  への寄与はほぼ実質的に無い。

以上の理由により、本発明の一実施の形態における基質の定量方法によると、阻害物質の影響を受けずに基質の定量を行うことが可能となる。

また、本発明に係る基質の定量方法の前記工程 (a) においては、前記作用極及び前記対極を同一平面上に配置することが好ましい。このようにすると、より簡便な基質の定量が可能となる。

この場合は、絶縁性の (第 1 の) 基板、前記 (第 1 の) 基板上に配置された作用極及び対極を含む電極系、並びに酸化還元酵素及び電子伝達体を含む試薬系を備えたバイオセンサを用いればよい。

また、前記工程 (a) において、前記作用極及び前記対極を、空間を隔てて対向させて配置することが好ましい。

この場合は、絶縁性の第 1 の基板、絶縁性の第 2 の基板、前記第 1 の基板上に配置された作用極及び前記第 2 の基板上に配置された対極を含

む電極系、並びに酸化還元酵素及び電子伝達体を含む試薬系を備えたバイオセンサを用いればよい。

ここで、本発明に係る基質の定量方法は、前記作用極に直流電位を印加する工程（e）、前記工程（e）において生じた前記電気信号を測定する工程（f）をさらに含むことが好ましい。このようにすると、工程（f）において測定される前記電気信号は、基質及び阻害物質に関する情報を含むため、交流測定と組み合わせることにより、工程（c）において測定された電気信号及び工程（f）において測定された電気信号に基づいて、基質だけでなく阻害物質の定量も可能となる。

また、交流電位の中心電位が、電子伝達体の酸化還元電位近傍に設定されていることが好ましい。前記中心電位は、特に、電子伝達体の酸化還元電位に対して $-0.4\text{ V} \sim +0.4\text{ V}$ の範囲内であることが好ましく、さらには、 $-0.1\text{ V} \sim +0.1\text{ V}$ の範囲内であることが好ましい。

また、交流電位の中心電位（ $E_{cen}(\text{V})$ ）が、阻害物質の作用極での反応が拡散律速領域となる電位領域内、またはその近傍に設定されていることが好ましい。特に、阻害物質の作用極での反応が拡散律速領域となる電位領域のなかで最も負の電位（ $E_{min}(\text{V})$ ）に対して、 $0.05\text{ V}$ 負の電位よりも正の電位であること、すなわち、前記中心電位と前記最も負の電位が、 $E_{cen} > E_{min} - 5(\text{V})$ を満たすことが好ましい。このようにすると、作用極に印加した電位の変調に対して、電子伝達体由来の電流変化を大きくし、かつ阻害物質由来の電流変化がほとんどないようにすることができる。したがって、基質と阻害物質が混合している試料液を用いた交流法による基質測定において、阻害物質による影響をより完全に排除することが可能となる。

なお、これら電子伝達体の酸化還元電位、及び阻害物質の反応が拡散律速となる電位は、前記物質を溶解した $0.1\text{ M}$ リン酸緩衝液（ $\text{pH} =$

7. 0) を電解液として用い、適切な参照極を組み合わせてグラッシーカーボンまたは金属電極を作用極として用いたサイクリックボルタンメトリーより見積もることができる。

また、バイオセンサに担持された電子伝達体の酸化還元電位は、上記リン酸緩衝液を用いてバイオセンサから電子伝達体を共存物とともに溶解・抽出し、得られた液を用いてサイクリックボルタンメトリーより見積もることができる。

ここで、作用極に印加する交流電位は、前記作用極とともに組み合わせて用いられる対極または参照極に対する電位（電圧）である。また、本発明における交流電位（電圧）は、時間  $t$  に依存して連続的または離散的に変調する波形を有する電位であればよく、近似的な交流電位を含む概念である。すなわち、本発明における交流電位は、少なくとも周期的に、

$$E(t_1) < E(t_2) \text{ 及び } E(t_2) > E(t_3)、\text{ または } \\ E(t_1) > E(t_2) \text{ 及び } E(t_2) < E(t_3)$$

（ただし、 $t_1 < t_2 < t_3$ ）を満たす電位であればよい。かかる波形を有するものとしては、例えばサイン波、矩形波及び階段波などが挙げられる。

本発明の基質の定量方法において用いる電気信号は、電気化学反応の進行に伴って変化する電気信号であればよく、例えば、電流、アドミッタンス、インピーダンス等が挙げられる。このなかでは、サイン波、または実質的にサイン波に近似できる階段波を有する電位を印加した場合、電気信号がインピーダンスであることが好ましい。電気信号として電流やアドミッタンスを用いることもできるが、これらをインピーダンスに変換し、得られたインピーダンスに基づいて基質の量を出力することが好ましい。矩形波を印加する場合には、電流を電気信号として得、その

電気信号の時間と交流電位に対する依存性（変化）に基づいて、基質の量に関する情報を得ることができる。

また、電極系がさらに参照極を含むことが好ましい。このようにすると、作用極に印加する電位が安定するので、より安定した基質測定を行うことができる。用いる参照極としては、 $\text{Ag} / \text{AgCl}$ あるいは飽和カロメル電極（SCE）などを用いることが可能であるが、これらに限定されることはなく、電位の安定した電極であれば他の電極を用いてもよい。

本発明の基質の定量方法において用いる作用極としては従来公知のものを特に制限なく用いることができる。なかでも、作用極が回転ディスク電極（以下、RDEと略称する）またはマイクロ電極であることが好ましい。一定速度で回転するRDE、あるいは電極表面への電子伝達体の側方拡散が電気化学反応に寄与する程度に小さい電極面積を有するマイクロ電極を用いると、静止バルク電極を用いた場合と比較して、作用極に印加した電位の変調に対する電子伝達体由来の電流変化をより大きくすることができる。そのため、基質に対する感度をより高くすることができる。マイクロ電極は半径 $50\text{ }\mu\text{m}$ （円形の場合）以下であるのが好ましく、さらには半径 $50\text{ }\mu\text{m}$ 以下 $20\text{ }\mu\text{m}$ 以上であるのが好ましい。また、これらの電極を用いた直流ボルタモグラムにおいて、触媒反応がない場合、及び電位走査速度を比較的大きくした場合でさえも、アノード及びカソード波の間のヒステリシスが非常に小さいことから示唆されるように、本発明による交流法を用いた基質測定を、より高い周波数を用いて安定に行うことができる。

本発明の基質の定量方法において使用される、阻害物質が溶解した試料液としては、基質と阻害物質を溶解した溶液、さらには基質と阻害物質が溶解している生体液、例えば血液、血漿、血清、尿、及び間質液な

どを用いることができる。また、阻害物質としては、アスコルビン酸（ビタミンC）、尿酸、及びアセトアミノフェンなどが挙げられる。

本発明の基質の定量方法において使用される酸化還元酵素は、試料液に溶存する測定対象となる基質の種類に応じて適切なものが選択される。例えば測定対象となる基質がグルコースの場合には、酸化還元酵素として、グルコースオキシダーゼ、ピロロキノリンキノン依存型グルコースデヒドロゲナーゼ、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド依存型グルコースデヒドロゲナーゼ及びニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリニン酸依存型グルコースデヒドロゲナーゼ等が挙げられ、基質がコレステロールの場合には、コレステロールオキシダーゼ、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド依存型コレステロールデヒドロゲナーゼ及びニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリニン酸依存型コレステロールデヒドロゲナーゼ等が挙げられる。また、上記酸化還元酵素以外にも、測定対象となる基質の種類に応じて、例えば、アルコールデヒドロゲナーゼ、乳酸オキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼ、アミノ酸オキシダーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼ、アシル-CoAオキシダーゼ、ウリカーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、フルクトースデヒドロゲナーゼなどを用いることができる。

本発明の基質の定量方法において使用される電子伝達体としては、フェロセン誘導体、フェリ／フェロシアン化物イオン、ルテニウムヘキサシアネート、オスミウムートリス（ビピリジニウム）、オスミウムージ（ビピリジニウム）イミダゾリニウムなどの金属錯体、p-ベンゾキノンなどのキノン誘導体、フェナジンメトサルフェートなどのフェナジニウム誘導体、メチレンブルーなどのフェノチアジニウム誘導体、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリニン酸などが挙げられる。

用いる酵素に対して高い電子移動速度を有する電子伝達体を、前記酵素に対する好適な組合せとして用いることができる。このなかでも、安定性が高い電子伝達体であるフェロセン誘導体、ルテニウムヘキサシアネート、オスミウムートリス（ビピリジニウム）及びオスミウムージ（ビピリジニウム）イミダゾリニウムがより好ましい。

これらのうち、酸化還元電位が比較的高い電子伝達体は、交流電位を印加した際に得られる、基質及び阻害物質それぞれに基づく電気信号を、分離よく得ることができるため、本発明を実施する上で特に好適である。

これらの電子伝達体は、ポリマーバックボーンに結合した形態、またはそれ自身の一部もしくは全部がポリマー鎖を形成するような形態であってもよい。また、酸素を電子伝達体として用いることも可能である。電子伝達体は、これらの一種または二種以上が使用される。

以下において、実施例を用いて本発明を詳しく説明するが、本発明はこれらのみに限定されるものではない。

### 実施例 1

0. 2 mMのフェロセンカルボン酸及び4  $\mu$  Mのグルコースオキシダーゼを試薬系として溶解したpH 7のリン酸緩衝液10 mLを得た。このリン酸緩衝液10 mLを、Pyrexガラス製の容器に入れて電解液として用い、作用極として直径3 mmの円形白金ディスク、対極には2 cm角の白金板を用いて電気化学セルを構築した。試料液としてアスコルビン酸を溶解したグルコース水溶液を、濃度がそれぞれ0.5 mM及び20 mM（約400 mg/dL）となるように添加した。

そして、一定時間経過後に、中心電位が対極に対して+0.1 V、振幅0.01 Vの交流電位を、作用極に印加した。この作用極における中心電位は、フェロセンカルボン酸の酸化還元電位に対して-0.1 V～



+ 0.1 V の範囲内であり、アスコルビン酸の作用極での反応が拡散律速領域となる電位領域の中で最も負の電位 (0.18 V (pH 7) vs Ag/AgCl) に対して 0.05 V 負の電位 (すなわち 0.13 V (pH 7) vs Ag/AgCl) よりも正の電位であった。交流電位の周波数は連続的に 16 mHz ~ 10 kHz で変化させ、具体的には (1.6、2.5、4.0、6.3 または 10)  $\times$  ( $10^{-2}$ 、 $10^{-1}$ 、1、10、 $10^2$  または  $10^3$ ) Hz の値を用いた。

交流電位の印加からさらに一定時間経過後、インピーダンス  $Z$  を測定し、複素インピーダンスプロットを行った。上述したように比較的低い周波数においては電流-電位間に位相差がほとんどないため、プロットは実数軸付近に現れ、徐々に周波数を高くしていくと、 $Z$  の大きさは減少し、そのプロット群はほぼ円弧を形成した。

次に、上記と同様の電解液の系列を、グルコース濃度を変化させて調製した。アスコルビン酸濃度は 0.5 mM と一定であり、グルコース濃度は 2、3、4、5、10 mM とした。これらの電解液を用い、上記と同様にして測定及びプロットを行った。より低いグルコース濃度の電解液を用いるに従い、得られる円弧の直径はグルコース濃度と一定の相関を有しながら、徐々に大きくなった。このような挙動はアスコルビン酸を含まないグルコース水溶液を試料液として用いた場合も同様であった。

したがって、得られた複素インピーダンスプロットにおける円弧の直径の大きさとグルコース濃度とを関係付けた検量線を予め作成しておくことにより、未知の濃度を有するグルコース水溶液について得られた複素インピーダンスプロットの円弧の直径から、アスコルビン酸の影響を受けることなくグルコース水溶液の濃度を求めることができた。このように、本発明の基質の定量方法を用いることにより、簡易な構成の測定系で、阻害物質による測定誤差を生じることなく、試料液中に含まれる

基質を正確に定量することができた。

## 実施例 2

本実施例では、実施例 1 で用いた電気化学セルのかわりに、以下の手順により作製したバイオセンサを用いて実施例 1 と同様の測定を行った。本実施例においては、図 1 及び図 2 に示す構造のバイオセンサを作製した。

図 1 は、本実施例において用いたバイオセンサの試薬系を取り除いた分解斜視図である。ガラス製の電気絶縁性の基板 1 上に、樹脂製の電極パターンマスクを設置し、金をスパッタリングすることによって作用極 2 及び対極 3 を形成した。なお、接着層として金とガラスとの間にクロムの層を形成し、両者の間の密着性を高めた。これら作用極 2 及び対極 3 は、それぞれリード 4 及び 5 によって、バイオセンサ外部の測定用端子と電氣的に接続した。

作用極 2 上に、酸化還元酵素及び電子伝達体を含む試薬系の層を形成した後、基板 1 に、スリット 6 を有するスペーサー 7、及び空気孔 8 を備えたカバー 9 を図 1 の一点鎖線で示すような位置関係をもって接着することにより、バイオセンサを作製した。スペーサー 7 のスリット 6 の部分に試料液供給路を形成した。センサの端部におけるスリット 6 の開放端部は、試料液供給路への試料供給口とした。

図 2 は、本発明によるバイオセンサの縦断面図である。基板 1 上に形成された作用極 2 上に、酸化還元酵素及び電子伝達体を含む試薬系 11 が形成した。図 2 に示すように、ここでは、試薬系 11 を、作用極 2 及び対極 3 からなる電極系上に形成した。

図 2 に示す構造のセンサの試料液供給路となるスリット 6 の開放端に試料液を接触させると、試料液は、試料液供給路内へ毛細管現象により

導入され、試薬系 1 1 を溶解して酵素反応が進行した。ここで、レシチンなどの両親媒性試薬による試料供給路の処理を予め行っておくと、試料液の導入はより均一かつ円滑であった。

このように、電極系を設けた基板 1 に、スペーサー 7 及びカバー 9 からなるカバー部材を組み合わせて、基板 1 との間に試料供給口から電極系に試料液を導く試料液供給路を形成すると、測定対象となる基質を含む試料液のセンサへの供給量を一定にすることができるので、測定の精度を向上させることができた。

試料液供給路を設けたセンサにおいては、試薬系は供給される試料液に溶解するように、電極系上に限らず試料液供給路内に露出する部分に設ければよかった。例えば、カバー 9 における試料液供給路内に露出する部分、基板 1 上における電極系とは接しないが試料液供給路内に露出する部分に設けてもよかった。また、試薬系は、複数に分割して、一つは基板上に、他の一つはカバー部材側に設けてもよかった。その際、各分割された層は、必ずしも全ての試薬を含む必要はなかった。例えば、酸化還元酵素と電子伝達体を別々の層に含ませてもよかった。

また、対極 3 または作用極 2 のうちどちらか一方を、それに対応するリード 5 または 4 とともに形成した絶縁性の第 2 の基板を、カバー 9 のかわりに用いてもよかった。この場合も、基板 1、スペーサー 7 及び第 2 の基板により試料液供給路が形成されるため、試料液のセンサへの供給量を一定にすることができ、測定の精度を向上させることができた。

フェロセンカルボン酸及びグルコースオキシダーゼを用いて、試薬系 1 1 を得、以上のようにして作製したセンサの試料液供給路の開口部、すなわちスペーサー 7 のスリット 6 の開放端部に、0.5 mM アスコルビン酸を溶解した 20 mM グルコース水溶液を試料液として滴下し、センサに供給した。そして、一定時間経過後に、中心電位が対極 3 に対し

て+0.1 V、振幅0.01 Vの交流電位を、作用極2に印加した。交流電位の周波数は実施例1に記した値と同一とした。さらに一定時間経過後、インピーダンス $Z$ を測定し、複素インピーダンスプロットを行った。その結果、実施例1と同様に、比較的低い周波数においては、プロットは実数軸付近に現れ、徐々に周波数を高くしていくと、 $Z$ の大きさは減少し、そのプロット群はほぼ円弧を形成した。

次に、実施例1に記した電解液と同様に、グルコース濃度の異なる電解液の系列を調製し、これらをそれぞれセンサに供給し、上記と同様にして測定及びプロットを行った。より低いグルコース濃度の電解液を用いるに従い、得られる円弧の直径はグルコース濃度と一定の相関を有しながら、徐々に大きくなった。このような挙動はアスコルビン酸を含まないグルコース水溶液を試料液として用いた場合も同様であった。

したがって、実施例1と同様の方法によって、得られた複素インピーダンスプロットの円弧の直径から、アスコルビン酸の影響を受けることなくグルコース水溶液の濃度を求めることができた。また、一定の単独の周波数において上記の交流測定を行い、得られた $Z$ の大きさ $|Z|$ を用いて、グルコース濃度を見積もることも可能であった。このように、本発明の基質の定量方法を用いることにより、簡易な構成の測定系で、阻害物質による測定誤差を生じることなく、試料液中に含まれる基質を正確に定量することができた。

### 実施例 3

本実施例では実施例1と同じ組成の電解液（グルコース濃度20 mM、アスコルビン酸濃度0.5 mM）及び電気化学セルを用いた。一定時間経過後に、一定の単独の周波数を有する、中心電位が対極を基準にして+0.1 V、振幅0.01 Vの交流電位を、作用極に印加した。そして、

一定時間経過後に、インピーダンス  $Z$  を測定した。次に、対極に対して  $+0.3\text{ V}$  の直流電位を、作用極に一定時間印加し、作用極－対極間に流れる直流電流  $I'$  を測定した。

実施例 1 と同様に、グルコース濃度の異なる電解液の系列を用い、上記と同様にして測定及びプロットを行った。より低いグルコース濃度の電解液を用いるに従い、実施例 1 の結果と同様に、得られる  $Z$  はグルコース濃度と一定の相関を有し、徐々に大きくなったので、 $Z$  の値を用いてグルコース濃度を見積もることが可能であった。

別途、対極に対して  $+0.3\text{ V}$  の直流電位を印加し、また、作用極に一定時間印加し、作用極－対極間に流れる直流電流を測定する方法により、アスコルビン酸非存在下における直流電流  $I$  のグルコース濃度との関係 ( $I-G$ )、及びグルコース非存在下における直流電流  $I$  のアスコルビン酸濃度との関係 ( $I-A$ ) を調べた。 $I-G$ 、 $I-A$  は各々、ほぼ良好な比例関係を示すことがわかった。一方、アスコルビン酸が一定濃度存在している場合の直流電流  $I$  とグルコース濃度との関係、及びグルコースが一定濃度存在している場合の直流電流  $I$  とアスコルビン酸濃度との関係は各々、ほぼ良好な線形関係を示すこともわかった。上記測定により得られた直流電流  $I'$  はグルコース及びアスコルビン酸のそれぞれによりもたらされる電流の総和であると結論付けることができた。

上記したように、交流測定により得た  $Z$  の値を用いてグルコース濃度を見積もることが可能であった。このようにして求めたグルコース濃度を  $I-G$  に適用すると、上記測定により得た  $I'$  のうちグルコースに起因する分の電流を知ることができ、これを差し引くことにより  $I'$  のうちアスコルビン酸に起因する分の電流を知ることができた。この電流を  $I-A$  に適用することにより、結果としてアスコルビン酸濃度を見積もることが可能であった。

このように、本実施例の基質の定量方法によると、阻害物質の影響を受けない基質の測定とともに阻害物質の定量を行うことができた。直流電流を基にしたグルコース及びアスコルビン酸に対する検量線、すなわち  $I - G$  及び  $I - A$  は、測定毎に作成するのではなく、予め得ておけばよかった。

なお、本実施例では、交流電位を印加して  $Z$  を測定するステップを経てから、直流電位を印加して  $I'$  を測定するステップを実行したが、ステップを実行する順は逆であってもよかった。また、実施例 2 と同様に、バイオセンサを用いても同様の測定を行うことが可能であった。

#### 実施例 4

本実施例では、電極系に参照極をさらに含む電気化学セルを用いた。電解液、作用極及び対極は実施例 1 と同じものを用い、参照極には銀／塩化銀電極 ( $Ag / AgCl$  電極) を用いて電気化学セルを構築した。試料液としてアスコルビン酸を溶解したグルコース水溶液を、それぞれの濃度が順に  $0.5 \text{ mM}$ 、及び  $20 \text{ mM}$  (約  $400 \text{ mg / dL}$ ) となるように添加した。

一定時間経過後に、中心電位が参照極を基準にして  $+0.36 \text{ V}$ 、振幅  $0.01 \text{ V}$  の交流電位を、作用極に印加した。この作用極における中心電位は、フェロセンカルボン酸の酸化還元電位に対して  $-0.1 \text{ V} \sim +0.1 \text{ V}$  の範囲内であり、かつアスコルビン酸の作用極での反応が拡散律速領域となる電位領域の中で最も負の電位 ( $0.18 \text{ V (pH 7)}$ )

$v_s \text{ } Ag / AgCl$ ) に対して  $0.05 \text{ V}$  負の電位 ( $0.03 \text{ V (pH 7)}$ )  $v_s \text{ } Ag / AgCl$ ) よりも正の電位であった。交流電位の周波数は実施例 1 で用いた値と同様とした。

さらに一定時間経過後に、インピーダンス  $Z$  を測定し、複素インピー

ダンスプロットを行ったところ、実施例 1 と同様に、比較的低い周波数においては、プロットは実数軸上に現れた。また、徐々に周波数を高くしていくと、 $Z$  の大きさは減少し、そのプロット群はほぼ円弧を形成した。

次に、実施例 1 に記した電解液と同様に、グルコース濃度の異なる電解液の系列を調製し、これらの電解液を用い、上記と同様にして測定及びプロットを行った。より低いグルコース濃度の電解液を用いるに従い、得られる円弧の直径はグルコース濃度と一定の相関を有しながら、徐々に大きくなった。このような挙動はアスコルビン酸を含まないグルコース水溶液を試料液として用いた場合も同様であった。

したがって、実施例 1 と同様の方法によって、得られた複素インピーダンスプロットの円弧の直径から、アスコルビン酸の影響を受けることなくグルコース水溶液の濃度を求めることができた。また、一定の単独の周波数において上記の交流測定を行い、得られた  $Z$  の大きさ  $|Z|$  を用いて、グルコース濃度を見積もることも可能であった。

また、参照極の使用により、作用極の電位がより安定して変移するため、得られる  $Z$  の値は、実施例 1 及び 2 の場合と比較してより安定した。このように、本実施例の基質の定量方法により、阻害物質の影響を受けない基質の測定をより安定して行うことが可能であった。

また、実施例 2 と同様にしてセンサを作製し、センサにアスコルビン酸とグルコースを含む試料液を供給した直後に、塩化カリウムと寒天からなる塩橋を介して、銀／塩化銀電極を試料供給口付近の試料液と接触させた。作用極に印加した中心電位が参照極に対して 0.36 V、振幅 0.01 V の交流電位であることを除き、実施例 2 と同様にして交流測定を行った。その結果、実施例 2 において前述した結果とほぼ同様の結果が得られた。ただし、得られる  $Z$  の値はより安定した。したがって、

本実施例の基質の定量方法により、センサと共に参照極を使用した場合であっても、阻害物質の影響を受けない基質の測定をより安定に行うことが可能であった。

なお本実施例では、塩橋を介して、銀／塩化銀電極を試料供給口付近の試料液と接触させたが、銀／塩化銀電極をセンサ基板上にスクリーン印刷によって作製して使用しても同様の効果を得ることができる。

#### 実施例 5

本実施例においては、まず、1 mMのルテニウムヘキサシアネート及び0.6 kU/mLのピロロキノリンキノン依存型グルコースデヒドロゲナーゼを試薬系として溶解したpH 7のリン酸緩衝液10 mLを得た。このリン酸緩衝液10 mLをPyrexガラス製の容器に入れて電解液として用い、作用極として直径3 mmの円形白金ディスク、対極として2 cm角の白金板を、参照極としてAg/AgCl (sat. KCl)を用いて電気化学セルを構築した。

そして、一定時間経過後に、中心電位が参照極に対して+0.9 Vで、振幅が0.01であるの交流電位を、作用極に印加した。この作用極における中心電位は、ルテニウムヘキサシアネートの酸化還元電位に対して-0.4 V～+0.4 Vの範囲内であり、アスコルビン酸の作用極での反応が拡散律速領域となる電位領域のなかで最も負の電位(0.18 V (pH 7) vs Ag/AgCl)に対して0.05 V負の電位(0.13 V (pH 7) vs Ag/AgCl)よりも正の電位であった。交流電位の周波数は連続的に16 mHz～10 kHzで変化させ、具体的には実施例1に示した値と同一の値を用いた。

交流電位の印加からさらに一定時間経過後に、インピーダンスZを測定し、複素インピーダンスプロットを行った。図3の●で示したよう



に、グルコースが存在しない場合、ほぼ直線を形成するプロットが得られた。試料液としてグルコース水溶液を、その濃度が10 mMとなるように添加したところ、図3の▲で示したように、プロット群は実数軸付近に現れ、徐々に周波数を高くしていくと、Zの大きさは減少し、そのプロット群はほぼ円弧を形成した。

次に、上記の電解液にアスコルビン酸を濃度0.5 mMとなるように添加した。上記と同様にして、測定及びプロットを行ったところ、図3の■で示したように10 mMグルコース水溶液を添加したときとほぼ同じ半円を示すプロット群が得られた。

このように、作用極に印加する交流電位の中心電位を、電子伝達体の酸化還元電位に対して $-0.4\text{ V} \sim +0.4\text{ V}$ の範囲内であり、かつ阻害物質の作用極での反応が拡散律速領域となる電位領域のなかで最も負の電位に対して0.05 V負の電位よりも正の電位であるときにも、複素インピーダンスプロット群の円弧の直径から、アスコルビン酸の影響を受けることなくグルコース水溶液の濃度を求めることができた。さらには、ルテニウムヘキサシアネートの酸化還元電位により近い0.8 Vの中心電位を有する交流電位を印加した場合にも、同様の定量が可能であった。また、ルテニウムヘキサシアネートが本発明における非常に有効な電子伝達体として機能すること、及びピロロキノリンキノン依存型グルコースデヒドロゲナーゼが本発明における非常に有効な酸化還元酵素であることが本実施例により実証された。

#### 実施例 6

本実施例においては、作用極を白金製の回転ディスク電極(RDE)とした点以外は実施例1と同じ電気化学セルを用い、実施例1と同じ試料液及び測定条件を用いて測定を行った。

その結果、実質的には実施例 1 とほぼ同様の結果が得られたが、実施例 1 の結果と比較すると、円弧の直径は減少し、より高い周波数において実数軸上のプロットが得られた。これは、RDEを用いると、静止電極を用いた場合と比較して、作用極に印加した電位の変調に対する電子伝達体由来の電流変化が大きくなるためであった。

次に、実施例 1 に記した電解液と同様、グルコース濃度の異なる電解液の系列を調製し、これらをそれぞれ用いて、上記と同様にして測定及びプロットを行った。より低いグルコース濃度の電解液を用いるに従い、得られる円弧の直径はグルコース濃度と一定の相関を有しながら、徐々に大きくなった。このような挙動はアスコルビン酸を含まないグルコース水溶液を試料液として用いた場合と同様であった。静止電極のかわりにRDEを用いても、電位変調に対する阻害物質由来の電流変化の大きさに対してはほとんど影響はみられなかった。

したがって、この直径の大きさより、グルコース濃度を測定することが可能であった。特筆すべきことに、グルコース濃度の変化に対する $Z$ の値の変化は実施例 1 で得られた結果よりも大きいものであり、 $Z$ の値もより安定であった。また、一定の単独の周波数において交流測定を行い、得られた $Z$ によってグルコース濃度を見積もることもまた可能であった。このような、RDEを用いることによる効果は、静止電極を用い、試薬系及び試料液を含む液を定常的に攪拌することによっても同様に得ることができた。

また、電極表面への電子伝達体の側方拡散が電気化学反応に寄与する程度に小さい電極面積を有するマイクロ電極をRDEのかわりに用いて、本実施例と同様の測定を行った場合においても、ほぼ同様の結果が得られた。

マイクロ電極のスケールについては、電極形状を円に換算したときに、

半径  $20\ \mu\text{m}$  ～ 約  $50\ \mu\text{m}$ 、電極面積  $1000 \sim 8000\ \mu\text{m}^2$  の範囲にあるものが特に好適であった。電極として、非常に小さな径を有するカーボンファイバー、白金、金などをガラスキャピラリーに封入して、電極表面を露出させることにより作製したもの、または市販されているものを用いることができた。また、フォトリソグラフィまたはエッチングなどの半導体加工プロセスを利用して基板上に作製したマイクロ電極も用いることができた。このようなマイクロ電極の使用は、実施例 2 のようにバイオセンサを用いて測定を行う場合にも特に好適であった。

以上のように、本発明の基質の定量方法において、RDEあるいはマイクロ電極を作用極として用いることによって、安定かつ感度の高い基質測定が可能であった。

なお、以上の実施例では、作用極に印加する交流電位の中心電位を、対極を基準にして  $+0.1\ \text{V}$ 、または参照極を基準にして  $+0.36\ \text{V}$  または  $+0.9\ \text{V}$  としたが、この値に限定されることはなく、電子伝達体の酸化還元電位付近であればよく、用いる電子伝達体の種類に応じて好適な値が選択されうる。参照極を用いるか否かによってもこの値は変化し、好ましい値が選択される。

また、以上の実施例では、電位の振幅を  $0.01\ \text{V}$  としたが、この値に限定されることはなく、実質的に交流測定を行えるような振幅であれば良い。使用できる振幅の値は測定装置の性能により決定されるが、好ましくは  $1 \sim 50\ \text{mV}$  である。

以上の実施例における交流電位の周波数は  $16\ \text{mHz} \sim 10\ \text{kHz}$  としたが、これらの値及び範囲に限定されるものではない。交流法により得られる電気信号が基質濃度に応じて有意に変化する周波数であればよい。

以上の実施例で用いた直流電位は、対極を基準にして  $+0.3\ \text{V}$  とし

たが、この値に限定されることはなく、電子伝達体及び阻害物質が十分に酸化（あるいは還元）される電位であればよく、かつ用いる電子伝達体の種類に応じて好適な値が選択されうる。また、参照極を用いる場合にはその種類によっても変化し得、対応する好適な値が選択される。

また、直流電位の印加によって得る電気信号は、以上の実施例で記した直流電流に限定されるものではない。例えば、作用極における通電電荷量であってもよい。

以上の実施例において用いた、反応のための一定時間は、本発明を実施するにあたって、観測可能な大きさの出力をほぼ安定に得ることのできる時間であればよい。

電極の材料として、以上の実施例においては、白金あるいは金を用いたが、これに限定されることはない。他の材料を用いた電極の例として、パラジウム及びカーボンの電極が挙げられる。さらには白金、金、パラジウム、及びカーボンのいずれかを主たる材料とする混合材料の電極を用いることも可能である。また、以上の実施例においては、作用極と対極を同一の材料を用いた電極としたが、それぞれが別の材料によって作製された電極であってもよい。

以上の実施例においては、バイオセンサにおける電極及びそれらのパターンの作製方法としてマスクを通したスパッタリング法を用いたが、これに限定されず、例えば、スパッタリング法、イオンプレーティング法、蒸着法、化学蒸着法のいずれかで作製した金属膜をフォトリソグラフィー及びエッチングと組み合わせてパターン作製をしてもよい。パターン形成はレーザーによる金属のトリミングによっても行うことができる。金属ペーストを用いて基板にスクリーン印刷を施し、電極パターンを形成してもよい。さらには、パターン化した金属箔をそのまま絶縁性基板上に接着させてもよい。電極の材料がカーボンを主とする物質であ

る場合には、基板にスクリーン印刷を施し、電極パターンを形成することができる。

これら電極系の形状、配置、個数、大きさ等は以上の実施例に示したものに限定されるものではない。例えば、作用極と対極をそれぞれ異なる絶縁性基板上に形成させてもよいし、作用極と対極をそれぞれ複数個形成させてもよい。形状はくし型であってもよい。また、リード及び端子の形状、配置、個数、大きさ等も上記実施例に示したものに限定されるものではない。

RDEの回転速度に限定はない。またマイクロ電極の電極面積は、電極表面への電子伝達体の側方拡散が電気化学反応に寄与する大きさの範囲内であればよい。

試料液中の基質及び阻害物質の濃度は以上の実施例に記した値に特に限定されない。試料液の量についても限定はない。

試薬系に含まれる各試薬の量あるいは濃度は、以上の実施例に記した値に限定されない。酵素反応及び電気化学反応が十分に進行する量であればよい。

以上の実施例における試薬系全体または試薬系に含まれる試薬のうち一つあるいは複数を作用極に固定化することによって、酵素、電子伝達体を不溶化または非溶出化させてもよい。固定化する場合は、共有結合法、架橋固定法または配位結合や特異的結合性の相互作用を用いた固定化法を用いることが好ましい。あるいは、酵素、電子伝達体を高分子物質によって包摂し、擬似的な固定化状態を与える方法もまた、容易な試薬系形成法として有効である。用いられる高分子は、疎水的であっても親水的であってもよいが、後者がより好ましい。例えば、親水性の高分子の例として、水溶性セルロース誘導体であるカルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、エチルセルロースなど、あるいは

ポリビニルアルコール、ゼラチン、ポリアクリル酸、デンプンとその誘導体、無水マレイン酸重合体、メタクリレート誘導体などが挙げられる。

また、以上の実施例における試薬系にpH緩衝剤を含ませることがより好ましい。これにより、反応液のpHを酵素活性に適した値に調整し、測定時に酵素を効率よく機能させることができる。さらには、阻害物質の多くはプロトンが関与する電気化学反応をするので、その阻害反応が拡散律速となる電位領域は電解液のpHによって変化するが、pH緩衝剤を用いることにより、その電位領域を一定の値に固定することが可能となる。したがって、本発明による阻害物質の影響の排除をより安定に行うことができる。pH緩衝剤としては、例えば、リン酸塩、酢酸塩、ホウ酸塩、クエン酸塩、フタル酸塩、またはグリシンのうち、一種または複数を含む緩衝剤を用いることができる。また、上記塩の水素塩の一種あるいは複数をを用いてもよい。また、いわゆる「グッドの緩衝液」に用いられる試薬を用いてもよい。これらのpH緩衝剤がセンサ系内に含まれる場合の形態は、センサの構造によって変化するものであり、例えば固体であっても溶液であってもよい。

以上の実施例に述べたバイオセンサにおいては、測定対象となる基質を含む溶液の量を容易に一定に規定することにより測定精度を向上させることができるため、スぺーサーが上記バイオセンサの構成要素として含まれていることが好ましい。しかし、一定体積の試料を採取することのできる器具と合わせて本発明で述べたバイオセンサを用いる場合には、スぺーサー及びカバーからなるカバー部材は必ずしも必要ではない。

#### 産業上の利用の可能性

以上のように本発明によれば、簡易な構成の測定系により、阻害物質による測定誤差を生じることなく、試料液中に含まれる基質を正確に定

量することが可能な方法を提供することができる。

## 請 求 の 範 囲

1. 電極系及び試薬系を用い、溶解した阻害物質及び基質を含む試料液の前記基質を定量する方法であって、

(a) 酸化還元酵素及び電子伝達体を含む試薬系の存在下で、作用極及び対極を含む電極系に、溶解した阻害物質及び基質を含む試料液を供給する工程、

(b) 前記作用極に交流電位を印加し、前記電子伝達体の酸化還元反応を生じさせる工程、

(c) 前記酸化還元反応に基いて生じた電気信号を前記電極系により測定する工程、ならびに

(d) 前記電気信号に基づいて前記基質を定量する工程を含むことを特徴とする基質の定量方法。

2. 前記工程(a)において、前記作用極及び前記対極を同一平面上に配置することを特徴とする請求の範囲第1項記載の基質の定量方法。

3. 前記工程(a)において、前記作用極及び前記対極を、空間を隔てて対向させて配置することを特徴とする請求の範囲第1項記載の基質の定量方法。

4. 前記作用極に直流電位を印加する工程(e)、及び前記工程

(e)において生じた電気信号を測定する工程(f)をさらに含むことを特徴とする請求の範囲第1項記載の基質の定量方法。

5. 前記工程(b)において、前記交流電位の中心電位が、前記電子伝達体の酸化還元電位に対して $-0.4\text{ V} \sim +0.4\text{ V}$ の範囲内にあり、かつ前記阻害物質の前記作用極での反応が拡散律速領域となる電位領域のなかで、最も負の電位から $0.05\text{ V}$ 負の電位よりも正の電位であることを特徴とする請求の範囲第1項記載の基質の定量方法。



6. 前記工程 (b) において、前記交流電位の中心電位が、前記電子伝達体の酸化還元電位に対して  $-0.1\text{ V} \sim +0.1\text{ V}$  の範囲内にあり、かつ前記阻害物質の前記作用極での反応が拡散律速領域となる電位領域のなかで、最も負の電位から  $0.05\text{ V}$  負の電位よりも正の電位であることを特徴とする請求の範囲第 1 項記載の基質の定量方法。

7. 前記電気信号がインピーダンスであることを特徴とする請求の範囲第 1 項記載の基質の定量方法。

8. 前記電極系がさらに参照極を含むことを特徴とする請求の範囲第 1 項記載の基質の定量方法。

9. 前記作用極が回転ディスク電極またはマイクロ電極であることを特徴とする請求の範囲第 1 項記載の基質の定量方法。

10. 前記酸化還元酵素がグルコースオキシダーゼまたはピロロキノリンキノン依存型グルコースデヒドロゲナーゼであり、前記電子伝達体がフェロセンカルボン酸であることを特徴とする請求の範囲第 1 項記載の基質の定量方法。

11. 前記酸化還元酵素がピロロキノリンキノン依存型グルコースデヒドロゲナーゼであり、前記電子伝達体がルテニウムヘキサシアネートであることを特徴とする請求の範囲第 1 項記載の基質の定量方法。

FIG. 1

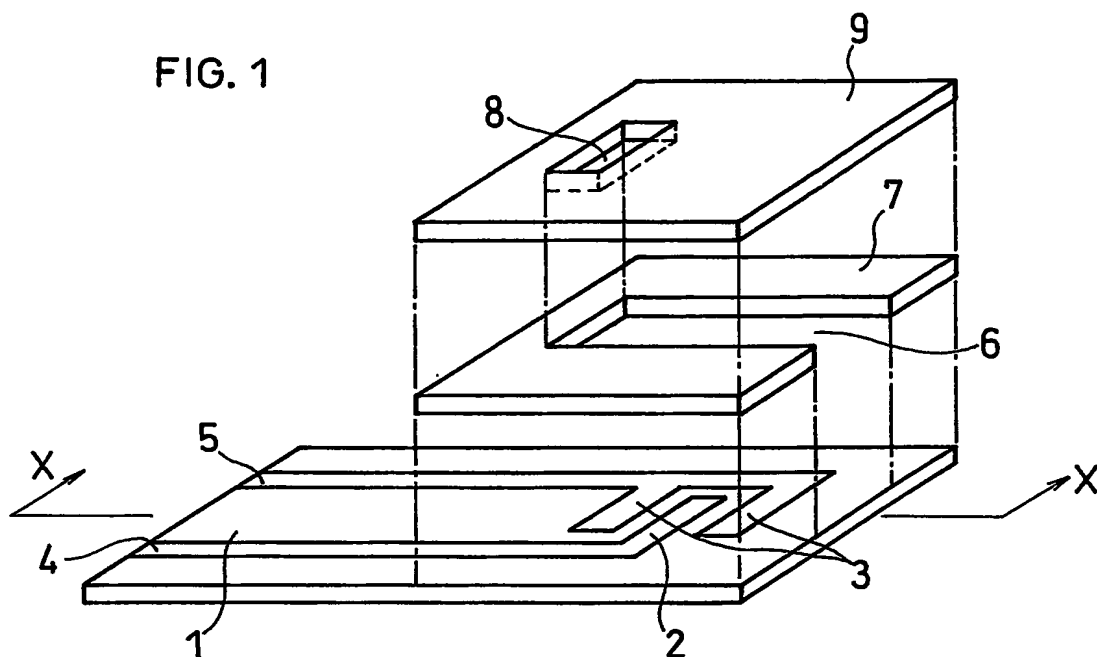


FIG. 2

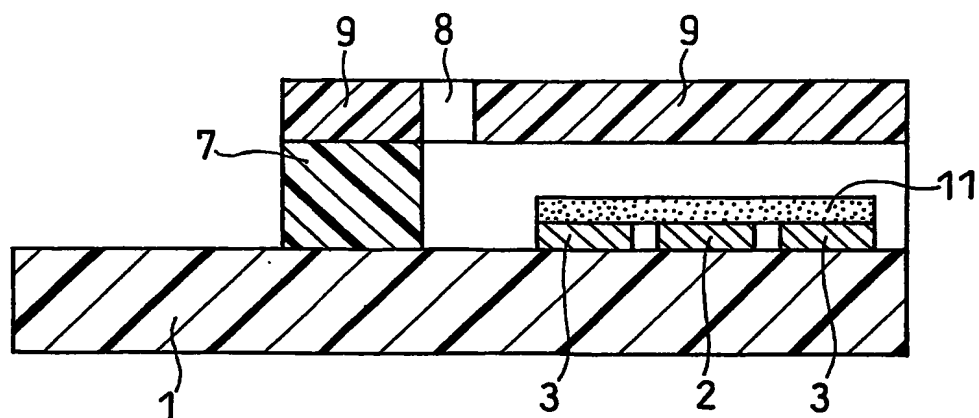


FIG. 3

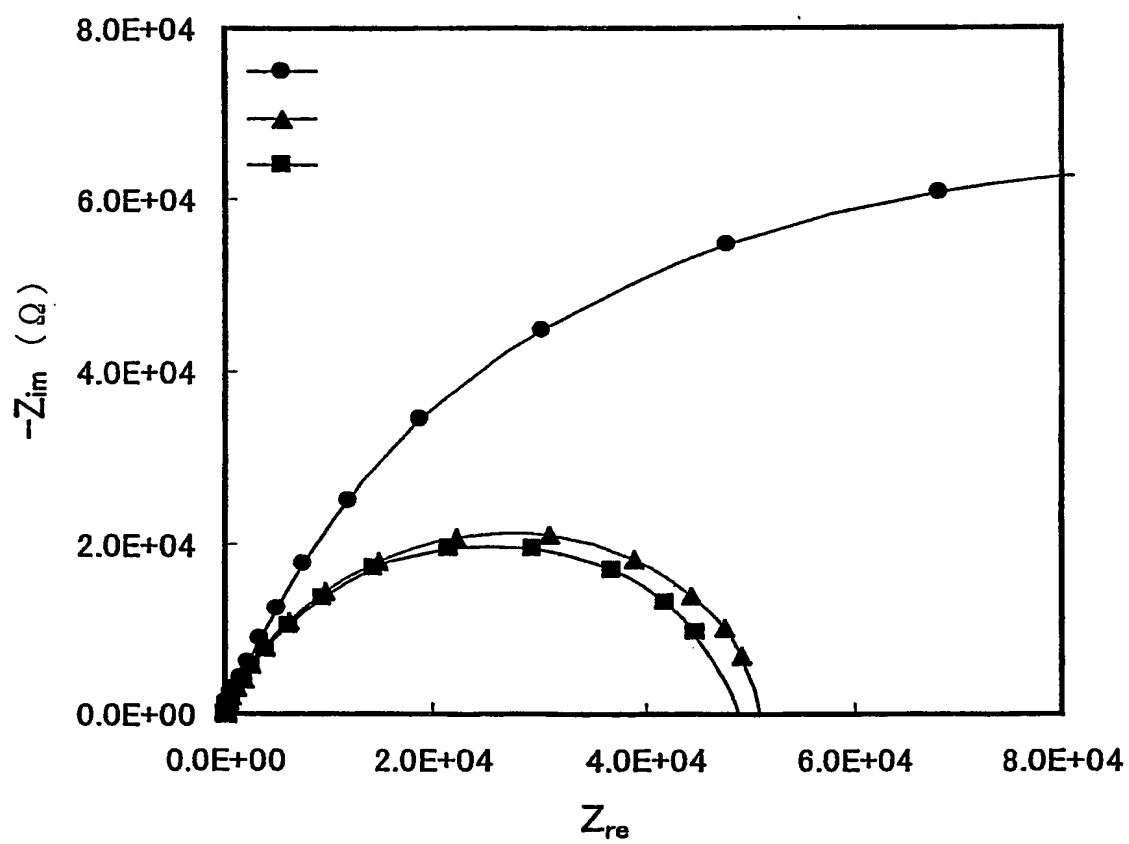


FIG. 4

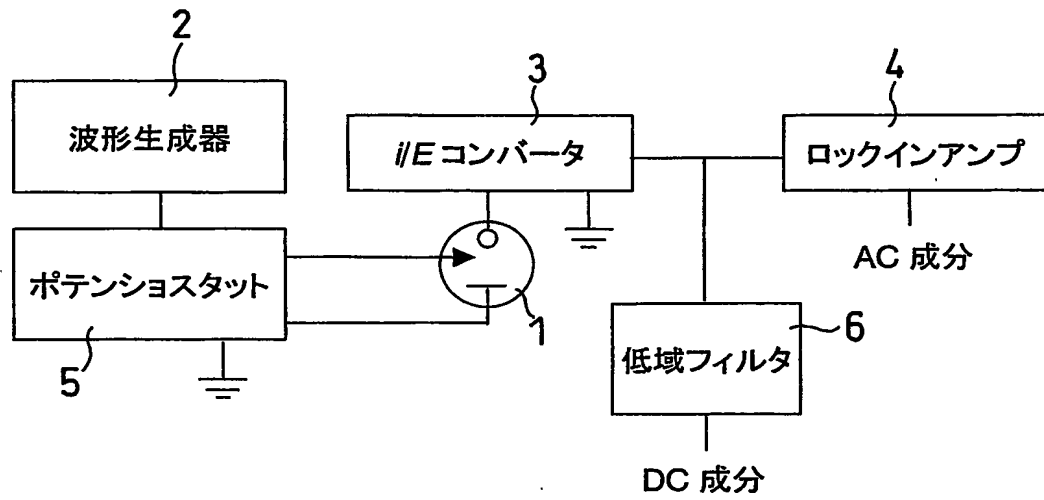
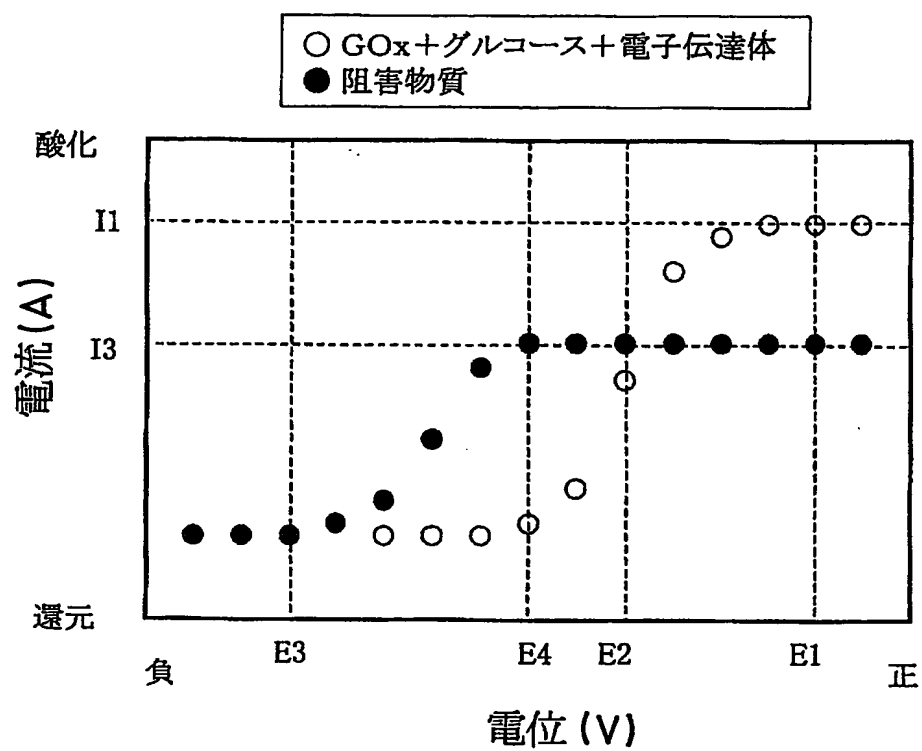


FIG. 5



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP03/02613

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> G01N27/327

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> G01N27/327Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2003  
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2003 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2003Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CAPLUS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Susumu KUWABATA, Manobe SETANI, "Glucose Oxidase no Denkyoku Shokubai Hanno no Koryu Sokutei", The Electrochemical Society of Japan Taikai Koen Yoshishu, 25 March, 2001 (25.03.01), 68th, page 344	1, 7, 10 2, 3, 8, 9, 11
Y	WO 97/39343 A1 (NUCLEARFUELS PLC.), 23 October, 1997 (23.10.97), Page 1 & GB 9607898 A & AU 2644497 A & CA 2251874 A & EP 894265 A & JP 2000-509488 A	1, 2, 3, 7, 9-11
Y	JP 9-159642 A (Dainippon Printing Co., Ltd.), 20 June, 1997 (20.06.97), Par. No. [0022]; Figs. 1, 6 (Family: none)	1-3, 7, 8, 10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
25 April, 2003 (25.04.03)Date of mailing of the international search report  
13 May, 2003 (13.05.03)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP03/02613

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	"Bisho Denkyoku o Mochiiru Denki Kagaku Sokutei-ho", Satoshi IINO, 10 February, 1998 (10.02.98), pages 137, 138	9
Y	ALVIN L. CRUMBLISS et al., THE ELECTROCHEMISTRY OF HEXACYANORUTHENATE AT CARBON ELECTRODES AND THE USE OF RUTHENIUM COMPOUNDS AS MEDIATORS IN THE GLUCOSE/GLUCOSE OXIDASE SYSTEM, Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry, 10 July, 1986 (10.07.86), Vol.206, No.1-2, pages 327 to 331	11
A	JP 5-215709 A (NGK Spark Plug Co., Ltd.), 24 August, 1993 (24.08.93), Full text (Family: none)	1-11
A	WO 99/32881 A1 (ROCHE DIAGNOSTICS CORP.), 01 July, 1999 (01.07.99), Full text & AU 2089299 A & CA 2310021 A & EP 1042667 A & JP 2001-527215 A & NO 20003228 A	1-11

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G01N27/327

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G01N27/327

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年  
 日本国公開実用新案公報 1971-2003年  
 日本国登録実用新案公報 1994-2003年  
 日本国実用新案登録公報 1996-2003年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	桑畑進、瀬谷真延, グルコースオキシダーゼの電極触媒反応の交流測定, 電気化学会大会講演要旨集, 2001. 03. 25, 68th, p. 344	1, 7, 10
Y		2, 3, 8, 9, 11
Y	WO 97/39343 A1 (NUCLEARFUELS PLC), 1997. 10. 23, p. 1 & GB 9607898 A & AU 2644497 A & CA 2251874 A & EP 894265 A & JP 2000-509488 A	1, 2, 3, 7, 9-11

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの  
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの  
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25. 04. 03

国際調査報告の発送日

13.05.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
 郵便番号100-8915  
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

竹中 靖典

2J

3010

電話番号 03-3581-1101 内線 3250



C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 9-159642 A (大日本印刷株式会社), 1997. 06. 20, 【0022】、図1、6 (ファミリーなし)	1-3, 7, 8, 10
Y	微小電極を用いる電気化学測定法, 飯野理, 1998. 02. 10, p. 137、138	9
Y	ALVIN L. CRUMBLISS et.al., THE ELECTROCHEMISTRY OF HEXACYANORUTHENATE AT CARBON ELECTRODES AND THE USE OF RUTHENIUM COMPOUNDS AS MEDIATORS IN THE GLUCOSE/GLUCOSE OXIDASE SYSTEM, Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry, 1986. 07. 10, Vol. 206, No. 1-2, p. 327-331	11
A	JP 5-215709 A (日本特殊陶業株式会社), 1993. 08. 24, 全文 (ファミリーなし)	1-11
A	WO 99/32881 A1 (ROCHE DIAGNOSTICS CORPORATION), 1999. 07. 01, 全文 & AU 2089299 A & CA 2310021 A & EP 1042667 A & JP 2001-527215 A & NO 20003228 A	1-11

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**